فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۳ ص. ۱۰-۱۶

مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان miR-192 در لنف نودهای بیماران سارکوئیدوزی به روش Real-timePCR و مقایسه بیان آنها با گروه کنترل

سمانه سادات راثی ورعی[۱]، عبدالرضا محمدنیا[۲*]، منیره موحدی[۱]، نغمه بهرامی[۴و۳]، صادق شیریان[۵]

[۱] گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۴] مرکز تحقیقات جراحی فک و صورت، دانشگاه علوم پزشکی، تهران

[۵] گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): mohamadnia.ar@gmail.com

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

چکیده

مقدمه و هدف: سارکوئیدوز (Sarcoidosis) بیماری با علت ناشناخته و بروز بیماری اغلب تدریجی است. بیماری ممکن است بی‌نشانه یا مزمن باشد. بررسی وجود فاکتورهایی مثل میکرو RNAها ممکن است باعث تشخیص‌های بهتر سارکوئیدوز شوند و به درك بهتر مکانیسم ایجاد بیماری سارکوئیدوز کمك خواهند کرد.

مواد و روش: این مطالعه از نوع مورد - شاهد می‌باشد که پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق، تهیه ۴۰ نمونه بافت از گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل، با نظر پزشک متخصص جمع‌آوری گردید و سپس استخراج RNA از گره‌های لنفاوی انجام و نهایتا Realtime PCR برای مارکر miR-192 انجام شد.

نتایج: بیومارکر miR-192 در نمونه‌های گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز در ۲۸ نفر از ۴۰ نفر مثبت بود. میزان مثبت بودن این بیومارکر در افراد سالم ۱۷ نفر از ۴۰ نفر بود. بیومارکر miR-192 در بیماران سارکوئیدوزی نسبت به نمونه‌های سالم افزایش بیان نشان داد .

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، miR-192 ممکن است به عنوان نشانگر مولکولی برای بیماری سارکوئیدوز استفاده شود. همچنین پتانسیل قابل توجهی برای تشخیص، پیش آگهی و حتی درمان سارکوئیدوز دارد.

کلیدواژه‌ها: سارکوئیدوز، گره‌های لنفاوی، بافت، Realtime PCR.

مقدمه

مطالعات در مورد سارکوئیدوز نشان داد که شیوع این بیماری مزمن سیستمیک با منشا ناشناخته در سطح جهانی در آستانه افزایش است [۱, ۲].

بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک بیشترین شیوع بیماری در شمال اروپا و در زنان آفریقایی-آمریکایی وجود دارد [۱]. سارکوئیدوز در ایران نیز وجود دارد و به نظر می‌رسد شیوع آن در مناطق شمالی کشور بیشتر از مناطق جنوبی باشد [۱].

سارکوئیدوز یک بیماری سیستمیک گرانولوماتوز با تظاهرات بالینی غیر اختصاصی با علت ناشناخته است که در هر اندامی، اغلب در ریه‌ها و غدد لنفاوی داخل قفسه سینه ظاهر می‌شود [۳-۵]. این عارضه به اشکال متفاوتی ظاهر می‌شود [۶]. اگرچه این بیماری می‌تواند تقریبا در همه اندام‌ها مشاهده شود با این حال تقریبا ۹۰% بیماران سارکوییدوز غیر نکروز ریه‌ها درگیر می‌شوند [۷].

در بیشتر موارد سارکوئیدوز احتمالاً از قرار گرفتن یک عامل ژنتیکی حساس با یک عامل محیطی و احتمالاً یک عامل عفونی، ایجاد می‌شود [۸, ۹].

از آنجایی که تشخیص سارکوئیدوز از سایر بیماری‌های گرانولوماتوز مانند لنفوم، سل و تومورها بسیار مهم است، گرانولوم‌های غیرنکروزان باید در بیش از یک اندام با استثناء هر بیماری دیگر شناسایی شوند [۴]. همچنین تست ایمونولوژیک و اندازه گیری طیف وسیعی از بیومارکرها در بافت‌های بدن به بهبود دانش پاتوفیزیولوژی سارکوئیدوز کمک کرده است [۱۰].

شناخت مارکرهای زیستی، درمان‌های مولکولی هدفمند را امکان پذیر کرده‌اند و الگوی جدیدی از درمان شخصی سازی شده را ایجاد کرده و همچنین منجر به توسعه سریع داروهای جدید برای درمان سرطان ریه شده است [۱۱].

بیومارکرها ماده موجود در خون، ادرار و یا در برخی از بافت‌های بدن است که می‌تواند در موارد ابتلا به انواع بیماری‌ها مثل سرطان افزایش یابد [۱۲].

با توجه به تحقیقات اپیدمیولوژیک، سارکوئیدوز و نئوپلاسم ممکن است در حداقل ۲۵ درصد از بیماران که هر دو وجود دارند، از نظر اتیولوژیک مرتبط باشند [۱۳]. در تحقیقات مختلف بین ابتلا به سارکوئیدوز و سرطان ارتباط ویژه‌ای بیان شده است [۱۴].

روشن شدن نقش miRNA در بیماری‌ها در دهه ۲۰۰۰ آغاز شد [۱۵].

از آنجایی که miRNAها در ارتباطات سلولی نقش دارند، سودمندترین رویکرد، ارزیابی نقش آنها در یک مسیر سیگنالینگ خاص است که در سارکوئیدوز مهم است. باید تاکید کرد که مطالعات مبتنی بر ریزآرایه تایید کرده‌اند که تغییرات در بیان miRNA بر پاتوژنز سارکوئیدوز تأثیر می‌گذارد [۱۶].

miR-192، با انکوژنز سرطان معده، کولورکتوم و پروستات مرتبط است . علاوه بر این، نشان داده که miR-192 از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند و آپوپتوز سلولی را القا می‌کند [۱۷].

در تحقیق حاضر ارزیابی بیان miR-192 در لنف نودهای بیماران سارکوئیدوزی به روش Real-timePCR و مقایسه بیان آنها با گروه کنترل انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مورد - شاهد می‌باشد که پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق، تهیه ۳۰ نمونه بافت از گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۳۰ نمونه بافت سرطانی و ۳۰ نمونه کنترل (از گره‌های لنفاوی بیماران غیر از سارکوئیدوز)، با نظر پزشک متخصص ریه جمع آوری گردید و سپس استخراج RNA انجام گردید . بیماران با داشتن علائم مشابه از مطالعه حذف شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real-Time PCR:

مرحله استخراج RNA با استفاده از کیت (Cinna pure Cat no. PR891620) انجام شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجش شد.

سنتز cDNA برای میکرو RNA:

در این مطالعه از کیت ZIST ROYESH برای ساخت cDNAاستفاده شده است.

با استفاده ازZIST ROYESH Kit انجام شد. اجزا اصلی جهت Reverse Transcription در قالب RT Primer Mix و Reverse Transcriptase در کیت ارائه شده است.

انجام واکنش Real-time PCR

کیت ZIST ROYESH حاوی مواد لازم جهت انجام Real-time PCR شامل پرایمرهای Forward و Reverse و SYBR Master Mix Green می‌باشد.

جهت نرمالایز کردن بیان miRNA مورد نظر برای هر نمونه، نیاز به کالیبراتور (house keeping) می‌باشد که مواد لازم جهت cDNA سازی و Real-time PCR آن نیز مهیا شده است که در اینجا از U6 استفاده شده است.

cDNAهای سنتز شده به میزان ۱/۲ با آب مقطر Nuclease free رقیق شده و با استفاده از ترکیبات و طبق برنامه ذیل ، تحت واکنش Real-time PCR قرار می‌گیرد.

دماها و زمان‌های واکنش مطابق دستورالعمل کیت تنظیم گردید. پس از پایان هر واکنش تفسیر نتایج بر اساس منحنی‌های Amplification وMelting peak صورت می‌گرفت.

یافته‌ها

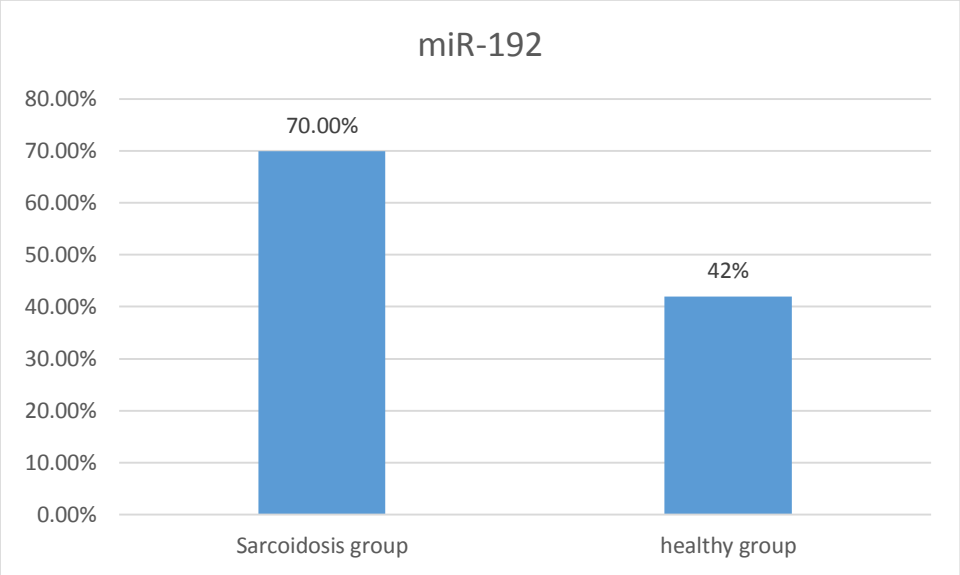
در این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه بافت از گروه‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار می‌گیرند. گروه‌ها با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی مقایسه شدند و از نظر میانگین سنی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور سن در گروه‌های مورد مطالعه اشکالی ایجاد نمی‌کند.

بیومارکر miR-192 در نمونه‌های گروه‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز در ۲۸ نفر از ۴۰ نفر مثبت بود. میزان مثبت بودن این بیومارکر در افراد سالم ۱۷ نفر از ۴۰ نفر بود. مقایسه آماری میزان مثبت شدن این بیومارکر در بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Two-sample binomial صورت گرفت که نشان دهنده‌ی تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه بود (P-value < 0.001).

جهت محاسبه تفاوت بیان بیومارکر مورد نظر، ابتدا Ct هر نمونه، تعیین گردید. میزان تفاوت بیان بیومارکر بین نمونه‌ی آزمایش در مقابل کنترل اندازه‌گیری شد، این‌کار با روش ΔΔ Ct بین دو گروه بیمار و سالم صورت گرفت.

جدول ۱- شرایط دمایی واکنش Real-time -PCR.

Cycles	Duration of cycles	Temperature
1	15 min	95ºC
35-40	15-30 seconds 60 seconds	95ºC 55-60 ºC
1	Melting Analysis	55-95 ºC



شکل ۱ - درصد مثبت بودن miR-192 در گروه بافت گروه‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و نمونه‌های سالم.

به این ترتیب، مقدار ΔΔ Ct برای miR-192 در نمونه‌های گروه‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز نسبت به افراد سالم عدد ۱/۱۵ – محاسبه شد.

پس از انجام محاسبات و با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ نشان داده شد که میزان بیان این مارکر در افراد بیمار ۲/۲۲ برابر افراد سالم است.

بحث

سارکوئیدوز یک بیماری سیستمیک گرانولوماتوز با تظاهرات بالینی غیر اختصاصی با علت ناشناخته است که در هر اندامی، اغلب در ریه‌ها و غدد لنفاوی داخل قفسه سینه ظاهر می‌شود [۴, ۵].

در این بیماری، توده کوچکی از بافت غیرطبیعی گرانولوما در اندام‌های خاص بدن شکل می‌گیرد. گرانولوماها، خوشه‌هایی از سلول‌های ایمنی هستند. در برخی مبتلایان، این گرانولوماها از بین نمی‌روند و در نتیجه موجب التهاب بافت و زخم شدن آن می‌شوند [۱۸].

موارد زیادی از بیماری ممکن است هیچ گاه بیماری بالینی را نشان ندهند و خودبخود کنترل می‌شوند. در این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه بافت از گروه‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بیش از ۱۰ سال است که پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه آسیب شناختی سببی، تشخیص و درمان این بیماری صورت گرفته است [۷].

با وجود پژوهش‌های گسترده بر روی بیومارکرها، هنوز مارکر واحدی قابلیت استفاده بالینی جهت تشخیص زودرس، بررسی متاستاز، تعیین پیش آگهی و یا پاسخ به درمان که حساسیت و اختصاصیت بالایی داشته باشد یافت نشده است [۱۹].

براساس یافته‌های بدست امده از آنالیز بیوانفورماتیکی بیان برخی RNAهای تنظیمی درمقایسه با نمونه‌های کنترل بسته به منشا سلول می‌تواند کاهش یا افزایش یابد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پروفایل‌های miRNA پلاسما اغلب الگوهای بیان miRNA بافت بیمار را منعکس می‌کنند که احتمالاً مربوط به آزادسازی miRNA از بافت است [۲۰].

در مطالعه Jeroen Maertzdorf و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که چهار miRNA (has-miRNA-182, miR-355, miR-15b, miR-340) در خون بین افراد مبتلا به سارکوئیدوز و افراد مبتلا به سل با استفاده از ریزآرایه تفاوت معنی‌داری دارند [۲۱]. در مطالعه ما miR-192 در بیماران سارکوئیدوزی نسبت به نمونه‌های سالم افزایش بیان نشان داد.

شکل ۲- تفاوت بیان miR-192 در گروه بافت گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و نمونه‌های سالم.

در سال ۲۰۱۶ Kiszałkiewicz و همکارانش با هدف بررسی بیان miRNAهای انتخابی (miR-let7f, miR-16, miR-15b, miR-20a, miR-128a, miR-192 miR-221, miR-222) در ۹۴ بیمار سارکوییدوز ریوی و ۵۰ نمونه کنترل مطالعه‌ای را انجام دادند. [۲۲] ارزیابی بیان با تکنیک q-PCR در سلول‌های BALFو لنفوسیت‌های خون محیطی (لنفوسیت‌های PB) انجام پذیرفت.

در سلول‌های برونکوسکوپی و مایع برونکو الویولار لاواژ BALF ، بیان افزایش یافته miR-192وmiR-221 و بیان کاهش یافته miR-15b در بیماران نسبت به کنترل‌ها یافت شد. نتایج این مطالعه همراستا با نتایج مطالعه حاضر بود .

Zhao و همکارانش درسال ۲۰۲۰ در چین به دنبال الگوهای بیانی متمایز miRNA در سارکوییدوز و توبرکلوزیس، پروفایل‌هایmiRNA غدد لنفاوی ۳۱ فرد مبتلا به سارکوئیدوز، ۳۰ فرد مبتلا به لنفادنیت سلی و ۳۰ فرد گروه کنترل را مورد بررسی قرار دادند. [۲۳]. نتایج از بین چندین miRNA نشان داد که سطح بیان miR-185-5p در غدد لنفاوی می‌تواند به عنوان یک نشانگر کمکی برای تشخیص افتراقی سارکوئیدوز و لنفادنیت سلی در مقایسه با افراد سالم استفاده شود.

در خاتمه، درک بهتر مکانیسم‌های زیربنایی بیان miRNA و ارتباط با ژن‌های هدف آنها، بینش وسیع‌تری را برای استفاده از microRNAها به‌عنوان بیومارکرهای پیش آگهی یا درمانی ارائه می‌دهد [۱۵].

در مطالعه اخیر نیز افزایش بیان miR-192 در گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز نسبت به افراد سالم نشان داده شد. پیشنهاد می‌گردد که در گروه‌های بزرگ‌تری، تعداد miRNAهای بیشتری بررسی گردد تا نتایج مفیدتری برای تشخیص و درمان حاصل شود.

منابع

[1] Foumani AA, Akhoundzadeh N, Karkan MF. Sarcoidosis, a report from Guilan (an Iranian Northen province)(2001-09). Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2014; 31:282-8.

[2] Ungprasert P, Ryu JH, Matteson EL. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of sarcoidosis. Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes. 2019; 3(3): 358-75.

[3] Srinivasan M, Thangaraj SR, Arzoun H, Kulandaisamy LBG, Mohammed L, GK LB. The association of lung cancer and sarcoidosis: a systematic review. Cureus. 2022; 14 (1).

[4] Bak M, Jazwa A, Kasper L, Kachamakova-Trojanowska N, Jozkowicz A, Sladek K, et al. Involvement of microRNAs in the inflammatory pathways of pulmonary sarcoidosis. J Physiol Pharmacol. 2015; 66(5): 635-42.

[5] Pattnaik B, Sryma P, Mittal S, Agrawal A, Guleria R, Madan K. MicroRNAs in pulmonary sarcoidosis: a systematic review. Respiratory Investigation. 2020; 58(4): 232-8.

[6] Furukawa A, Uchida K, Ishige Y, Ishige I, Kobayashi I, Takemura T, et al. Characterization of Propionibacterium acnes isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism. Microbial Pathogenesis. 2009; 46(2): 80-7.

[7] Jazwa A, Kasper L, Bak M, Sobczak M, Szade K, Jozkowicz A, et al. Differential inflammatory microRNA and cytokine expression in pulmonary sarcoidosis. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2015; 63: 139-46.

[8] Negi M, Takemura T, Guzman J, Uchida K, Furukawa A, Suzuki Y, et al. Localization of Propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. Modern Pathology. 2012; 25(9): 1284-97.

[9] Bonham CA. Biomarkers in sarcoidosis: can microRNAs fill the gap? : American Thoracic Society; 2018. p. 1-2.

[10] Ahmadzai H, Sheng Joshua Loke W, Huang S, Herbert C, Wakefield D, Thomas PS. Biomarkers in sarcoidosis: a review. Current Biomarker Findings. 2014: 93-106.

[11] Planck A, Eklund A, Grunewald J. Markers of activity in clinically recovered human leukocyte antigen-DR17-positive sarcoidosis patients. European Respiratory Journal. 2003; 21(1): 52-7.

[12] Osman N, O'Leary N, Mulcahy E, Barrett N, Wallis F, Hickey K, et al. Correlation of serum CA125 with stage, grade and survival of patients with epithelial ovarian cancer at a single centre. Irish medical journal. 2008; 101(8): 245-7.

[13] Kachalia AG, Ochieng P, Kachalia K, Rahman H. Rare coexistence of sarcoidosis and lung adenocarcinoma. Respiratory Medicine Case Reports. 2014; 12:4-6.

[14] El Jammal T, Pavic M, Gerfaud-Valentin M, Jamilloux Y, Sève P. Sarcoidosis and cancer: a

complex relationship. Frontiers in Medicine. 2020; 7: 594118.

[15] Alipoor SD, Adcock IM, Garssen J, Mortaz E, Varahram M, Mirsaeidi M, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. European journal of pharmacology. 2016; 791: 395-404.

[16] Salamo O, Mortaz E, Mirsaeidi M. Noncoding RNAs: new players in pulmonary medicine and sarcoidosis. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2018; 58(2): 147-56.

[17] Sun J, Fan Z, Lu S, Yang J, Hao T, Huo Q. MiR-192 suppresses the tumorigenicity of prostate cancer cells by targeting and inhibiting nin one binding protein. International journal of molecular medicine. 2016; 37(2): 485-92.

[18] Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. Frontiers in immunology. 2013; 4:437.

[19] Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens M-R, Van den Bogaert W, Van Oosterom A, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT–PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. Annals of oncology. 2001; 12(1): 39-46.

[20] Crouser ED, Julian MW, Crawford M, Shao G, Yu L, Planck SR, et al. Differential expression of microRNA and predicted targets in pulmonary sarcoidosis. Biochemical and biophysical research communications. 2012; 417(2): 886-91.

[21] Maertzdorf J, Weiner 3rd J, Mollenkopf H-J, Network T, Bauer T, Prasse A, et al. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109(20): 7853-8.

[22] Kiszałkiewicz J, Piotrowski WJ, Pastuszak-Lewandoska D, Górski P, Antczak A, Górski W, et al. Altered miRNA expression in pulmonary sarcoidosis. BMC medical genetics. 2016; 17:1-12.

[23] Zhao Y-b, Li W, Zhang Q, Yin Y, Yang C-j, Xu W-x, et al. Distinct miRNA gene expression profiles among the nodule tissues of lung sarcoidosis, tuberculous lymphadenitis and normal healthy control individuals. Frontiers in Medicine. 2020; 7: 527433.

Evaluation of miR-192 expression in lymph nodes of sarcoidosis patients by Real-time PCR method and comparison of their expression with the control group

Rasi Varaei S. S. [1], Mohamadnia A.[2*], Movahedi M.[1], Bahrami N.[3,4], Shirian S.[5]

[1] Department of biochemistry, faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 Craniomaxillofacial Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Department of pathology, school of veterinary medicine, shahrekord University, shahrekord, Iran

* (Corresponding author): mohamadnia.ar@gmail.com

Received: December.2023 Accepted: January.2024

Abstract

Introduction: Sarcoidosis is a disease with an unknown cause and the onset of the disease is often gradual. The disease may be asymptomatic or chronic. Examining the presence of factors such as micro RNAs may lead to better diagnoses of sarcoidosis and help to better understand the mechanism of sarcoidosis.

Methods: This is a case-witness study that after obtaining permission from the ethics committee, 40 tissue samples from the lymph nodes of patients with sarcoidosis and 40 control samples were collected with the opinion of an expert doctor, and then RNA was extracted from the lymph nodes. Realtime PCR was done for miR-192 marker.

Results: miR-192 biomarker was positive in the lymph node samples of sarcoidosis patients in 28 out of 40 people. The positive rate of this biomarker in healthy people was 17 out of 40 people. miR-192 biomarker showed increased expression in sarcoidosis patients compared to healthy samples.

Discussion: According to the results of this study, miR-192 may be used as a molecular marker for sarcoidosis. It also has significant potential for diagnosis, prognosis and even treatment of sarcoidosis.

Keywords: lymph nodes, tissues, sarcoidosis, microorganisms, Realtime PCR.